



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die Übereinstimmung der
angehefteten Druckschrift
mit der gemäss Artikel 98
EPÜ veröffentlichten eu-
ropäischen Patentschrift
wird hiermit beglaubigt

The conformity of the
attached publication with
the specification of the
European patent pub-
lished under article 98
EPC is hereby certified

La publication accom-
pagnant cette attestation
est certifiée conforme au
fascicule du brevet euro-
péen publié conformé-
ment à l'article 98 CBE

Patent Nr.

Patent No.

Numéro du brevet

0417563



München, den
Munich,
Munich, le

23/10/06

**CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT**

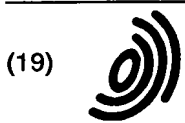
Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag.

For the President of the European Patent Office.

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

D.M. Furst-Fontaine

THIS PAGE BLANK (USPTO)



(19)

Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 417 563 B1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des
Hinweises auf die Patenterteilung:
05.07.2000 Patentblatt 2000/27

(51) Int. Cl.⁷: C12N 15/12, C07K 14/435,
C12N 1/21, C07K 14/715,
A61K 39/395

(21) Anmeldenummer: 90116707.2

(22) Anmeldetag: 31.08.1990

(54) TNF-bindende Proteine

TNF-binding proteins

Protéines qui lient le TNF

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK FR GB IT LI NL

(30) Priorität: 12.09.1989 CH 331989
08.03.1990 CH 74690
20.04.1990 CH 134790

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
20.03.1991 Patentblatt 1991/12

(60) Teilanmeldung:
99100703.0 / 0 939 121

(73) Patentinhaber:
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
4002 Basel (CH)

(72) Erfinder:

- Brockhaus, Manfred, Dr.
CH-4126 Bettingen (CH)
- Demblc, Zlatko, Dr.
CH-4053 Basel (CH)
- Gentz, Reiner, Dr.
D-7888 Rheinfelden (DE)
- Lesslauer, Werner, Dr.
D-4059 Basel (CH)
- Lötscher, Hansruedi, Dr.
CH-4313 Möhlin (CH)
- Schlaeger, Ernst-Jürgen, Dr.
D-7859 Efringen-Kirchen (DE)

(74) Vertreter: Braun, Axel et al
F.Hoffmann-La Roche AG
Patent Department (PLP),
124 Grenzacherstrasse
4070 Basel (CH)

(56) Entgegenhaltungen:

EP-A- 0 230 574	EP-A- 0 308 378
EP-A- 0 334 165	EP-A- 0 393 438
EP-A- 0 398 327	EP-A- 0 418 014
WO-A-90/13575	GB-A- 2 218 101
US-A- 4 770 995	

- BIOLOGICAL ABSTRACTS, Band 88, Nr. 12, 1988, Zusammenfassung Nr. 130862; D. NOVICK et al.: "Soluble cytokine receptors are present in normal human urine" & J. EXP. MED. 170(4), 1409-1414
- JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Band 264, Nr. 20, 15. Juli 1989, Seiten 11966-11973, The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.; P. SECKINGER et al.: "Purification and biologic characterization of a specific tumor necrosis factor alpha inhibitor"
- JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Band 264, Nr. 20, 15. Juli 1989, Seiten 11974-11980, The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.; H. ENGELMANN et al.: "A tumor necrosis factor-binding protein purifies to homogeneity from human urine protects cells from tumor necrosis factor toxicity"
- PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES; Band 87, Nr. 19, Oktober 1990, Seiten 7380-7384; P.W. GRAY et al.: "Cloning of human tumor necrosis factor (TNF) receptor cDNA and expression of recombinant soluble TNF-binding protein"

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist. (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

- JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Band 265, Nr. 3, 25. Januar 1990, Seiten 1531-1536, The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.; H. ENGELMANN et al.: "Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine"
- CELL, Band 61, Nr. 2, 20. April 1990, Seiten 351-359, Cell Press; H. LOETSCHER et al.: "Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor"
- CELL, Band 61, Nr. 2, 20. April 1990, Seiten 361-370, Cell Press; T.J. SCHALL et al.: "Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor"
- PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, Band 87, Nr. 16, August 1990, Seiten 6151-6155; R.A. HELLER et al.: "Complementary DNA cloning of a receptor for tumor necrosis factor and demonstration of a shed form of the receptor"
- SCIENCE, Band 248, 25. Mai 1990, Seiten 1019-1023; C.A. SMITH et al.: "A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins"
- EUR. JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Band 20, 1990, Seiten 1167-1174, VCH

Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, DE; P. SECKINGER et al.: "Tumor necrosis factor inhibitor: purification, NH₂-terminal amino acid sequence and evidence for antiinflammatory and immunomodulatory activities"

- THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Band 264, Nr. 25, 5. September 1989, Seiten 14927-14934, The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc., US; H.-P. HOHMANN et al.: "Two different cell types have different major receptors for human tumor necrosis factor (TNF α)"
- JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, Abstract, 20th Annual Meetings, 'Keystone Symposia on Molecular & Cellular Biology, supplement 15F, 1991, 1. - 7. April 1991, Seite 118, Zusammenfassung Nr. P 439, Wiley-Liss; K. PEPPEL et al.: "Chimaeric TNF-receptor - IgG molecule acts as soluble inhibitor of the mediated cytotoxicity"

Bemerkungen:

Die Akte enthält technische Angaben, die nach dem Eingang der Anmeldung eingereicht wurden und die nicht in dieser Patentschrift enthalten sind.

Beschreibung

[0001] Tumor Nekrosis Faktor α (TNF α , auch Cachectin), auf Grund seiner haemorrhagisch-nekrotisierenden Wirkung auf bestimmte Tumoren entdeckt, und Lymphotoxin (TNF β) sind zwei nahe verwandte Peptidfaktoren [3] aus der Klasse der Lymphokine/Cytokine, die im folgenden beide als TNF bezeichnet werden [siehe Uebersichtsarbeiten 2 und 3]. TNF verfügt über ein breites zelluläres Wirkungsspektrum. Beispielsweise besitzt TNF inhibierende oder cytotoxische Wirkung auf eine Reihe von Tumorzelllinien [2,3], stimuliert die Proliferation von Fibroblasten und die phagozytierende/cytotoxische Aktivität von myeloischen Zellen [4,5,6], induziert Adhäsionsmoleküle in Endothelzellen oder übt eine inhibierende Wirkung auf Endothel aus [7,8,9,10], inhibiert die Synthese von spezifischen Enzymen in Adipozyten [11] und induziert die Expression von Histokompatibilitätsantigenen [12]. Manche dieser TNF-Wirkungen werden über eine Induktion von anderen Faktoren oder durch synergistische Effekte mit anderen Faktoren, wie beispielsweise Interferonen oder Interleukinen erzielt [13-16].

[0002] TNF ist bei einer Reihe von Pathologischen Zuständen, beispielsweise Schockzuständen bei Meningococccen-Sepsis [17], bei der Entwicklung von Autoimmun-Glomerulonephritis bei Mäusen [18] oder bei cerebraler Malaria bei Mäusen [19] und beim Menschen [41] involviert. Ganz allgemein scheinen die toxischen Wirkungen von Endotoxin durch TNF vermittelt zu sein [20]. Weiterhin kann TNF wie Interleukin-1 Fieber auslösen [39]. Auf Grund der pleiotropen funktionellen Eigenschaften von TNF kann man annehmen, dass TNF in Wechselwirkung mit anderen Cytokinen bei einer ganzen Reihe weiterer pathologischer Zustände als Mediator von Immunantwort, Entzündung oder anderen Prozessen beteiligt ist.

[0003] Diese biologischen Effekte werden durch TNF über spezifische Rezeptoren vermittelt, wobei nach heutigem Wissensstand sowohl TNF α wie TNF β an die gleichen Rezeptoren binden [21]. Verschiedene Zelltypen unterscheiden sich in der Anzahl von TNF-Rezeptoren [22,23,24]. Solche ganz allgemein gesprochen TNF-bindenden Proteine (TNF-BP) wurden durch kovalente Bindung an radioaktiv markiertes TNF nachgewiesen [24-29], wobei die folgenden scheinbaren Molekulargewichte der erhaltenen TNF/TNF-BP-Komplexe ermittelt wurden: 95/100 kD und 75 kD [24], 95 kD und 75 kD [25], 138 kD, 90 kD, 75 kD und 54 kD [26], 100 \pm 5 kD [27], 97 kD und 70 kD [28] und 145 kD [29]. Mittels anti-TNF-Antikörper-Immunoaffinitätschromatographie und präparativer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) konnte ein solcher TNF/TNF-BP-Komplex isoliert werden [27]. Die reduktive Spaltung dieses Komplexes und anschließende SDS-PAGE-Analyse ergab mehrere Banden, die allerdings nicht auf TNF-Bindeaktivität getestet wurden. Da die spezifischen Bedingungen, die zu der Spaltung des Komplexes verwendet werden müssen, zur Inaktivierung des Bindeproteins führen [31], ist letzteres auch nicht möglich gewesen. Die Anreicherung von löslichen TNF-BP aus dem humanen Serum oder Urin mittels Ionenaustauscher-Chromatographie und Gelfiltration (Molekulargewichte im Bereich von 50 kD) wurde von Olsson et al. beschrieben [30].

[0004] Brockhaus et al. [32] erhielten durch TNF α -Ligandenaffinitätschromatographie und HPLC aus Membranextrakten von HL60-Zellen eine angereicherte TNF-BP-Präparation, die wiederum als Antigenpräparation zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen TNF-BP verwendet wurde. Unter Verwendung eines solchen immobilisierten Antikörpers (Immunoaffinitätschromatographie) wurde mittels TNF α -Ligandenaffinitätschromatographie und HPLC von Loetscher und Brockhaus [31] aus einem Extrakt von humaner Placenta eine angereicherte Präparation von TNF-BP erhalten, die in der SDS-PAGE-Analyse eine starke breite Bande bei 35 kD, eine schwache Bande bei etwa 40 kD und eine sehr schwache Bande im Bereich zwischen 55 kD und 60 kD ergab. Im übrigen zeigte das Gel im Bereich von 33 kD bis 40 kD einen Proteinhintergrundschmier. Die Bedeutung der so erhaltenen Proteinbanden war jedoch im Hinblick auf die Heterogenität des verwendeten Ausgangsmaterials (Placenta-Gewebe; vereinigtes Material aus mehreren Placenten) nicht klar.

[0005] Fusionsproteine bestehend aus der extrazellulären Domäne von nicht zur Immunglobulinfamilie gehörenden membranständigen humanen Proteinen, wie beispielsweise Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor, und Immunglobulinen, insbesondere der konstante Teil der schweren Kette, wobei die Fusion bevorzugt an den Hinge Bereich erfolgt, sind in EP 464533 erwähnt. Die Herstellung der erfindungsgemässen p55-Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Fusionsproteine ist allerdings weder in EP 464533 offenbar noch sind solche Fusionsproteine und deren vorteilhaften Eigenschaften überhaupt dort genannt.

[0006] Die vorliegende Erfindung betrifft somit weiterhin DNA-Sequenzen, die eine Kombination aus zwei Teil-DNA-Sequenzen umfassen, wobei die eine Teilsequenz für löslichen TNF-bindende Fragmente von TNF-Rezeptoren kodiert und wobei solche DNA-Sequenzen aus den folgenden auswählbar sind:

(a) Fragmente von DNA-Sequenzen, wie sie in Figur 1 dargestellt sind, wie deren komplementäre Stränge;

(b) DNA-Sequenzen, die mit wie unter (a) definierten Fragmenten hybridisieren;

(c) DNA-Sequenzen, die auf Grund der Entartung des genetischen Codes nicht mit Sequenzen, wie unter (a) und (b) definiert, hybridisieren, aber die für Polypeptide mit genau gleicher Aminosäuresequenz kodieren;

und die andere Teil-Sequenz, für alle Domänen ausser der ersten Domäne der konstanten Region der schweren Kette von humanen Immunglobulinen der Klasse IgG kodiert. Bevorzugt sind solche DNA-Sequenzen, welche von Nukleotid -185 bis 633 bzw. von Nukleotid -14 bis 633 der in Abbildung 1 gezeigten Sequenz reichen.

[0007] Die vorliegende Erfindung betrifft natürlich auch die von solchen DNA-Sequenzen kodierten rekombinanten Proteine. Selbstverständlich sind dabei auch solche Proteine umfasst, in deren Aminosäuresequenzen, beispielsweise mittels gezielter Mutagenese, Aminosäuren so ausgetauscht worden sind, dass dadurch die Aktivität der TNF-BP-Fragmente, nämlich die Bindung von TNF oder die Wechselwirkung mit anderen, an der Signalübertragung beteiligten Membrankomponenten, in einer gewünschten Art verändert oder erhalten wurden. Aminosäureaustausche in Proteinen und Peptiden, die im allgemeinen die Aktivität solcher Moleküle nicht verändern, sind im Stand der Technik bekannt und beispielsweise von H. Neurath und R.L. Hill in "The Proteins" (Academic Press, New York, 1979, siehe besonders Figur 6, Seite 14) beschrieben. Die am häufigsten vorkommenden Austausche sind: Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly, sowie solche in umgekehrter Weise. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Vektoren, die erfindungsgemässe DNA-Sequenzen enthalten und zur Transformation von geeigneten pro- wie eukaryotischen Wirtssystemen geeignet sind und deren Verwendung zur Expression der von den erfindungsgemässen DNA-Sequenzen kodierten Proteine führt. Schliesslich betrifft die vorliegende Erfindung auch noch mit solchen Vektoren transformierte Pro- wie eukaryotische Wirtssysteme, wie Verfahren zur Herstellung von erfindungsgemässen rekombinanten Verbindungen durch Kultivierung solcher Wirtssysteme und anschliessende Isolierung dieser Verbindungen aus den Wirtssystemen selbst oder deren Kulturüberständen.

[0008] Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch pharmazeutische Präparate, die wenigstens eines der erfindungsgemässen Proteine, gewünschtenfalls in Verbindung mit weiteren pharmazeutisch wirksamen Substanzen und/oder nicht-toxischen, inerten, therapeutisch verträglichen Trägermaterialien enthalten.

[0009] Die vorliegende Erfindung betrifft schliesslich die Verwendung solcher erfindungsgemässen Proteine einerseits zur Herstellung pharmazeutischer Präparate bzw. andererseits zur Behandlung von Krankheiten, bevorzugt solchen, in deren Verlauf TNF involviert ist.

[0010] Ausgangsmaterial für TNF-BP sind ganz allgemein Zellen, die solche TNF-BP in membrangebundener Form enthalten und die dem Fachmann ohne Beschränkungen allgemein zugänglich sind, wie beispielsweise HL60- [ATCC Nr. CCL 240], U 937- [ATCC Nr. CRL 1593], SW 480- [ATCC Nr. CCL 228] und Hep2-Zellen [ATCC Nr. CCL 23]. Diese Zellen können nach bekannten Methoden des Standes der Technik [40] oder zum Erzielen hoher Zelldichten nach dem bereits allgemein und im Detail für HL60-Zellen in Beispiel 2 beschriebenen Verfahren kultiviert werden. TNF-BP können dann nach bekannten Methoden des Standes der Technik mittels geeigneter Detergenzien, beispielsweise Triton X-114, 1-0-n-Octyl- β -D-glucopyranosid (Octylglucosid), oder 3-[(3-Cholylamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propan sulfonat (CHAPS), im besonderen mittels Triton X-100, aus den aus dem Medium abzentrifugierten und gewaschenen Zellen extrahiert werden. Zum Nachweis solcher TNF-BP können die üblicherweise verwendeten Nachweismethoden für TNF-BP, beispielsweise eine Polyäthylenglykol-induzierte Fällung des 125 I-TNF/TNF-BP-Komplexes [27], im besonderen Filterbindungstests mit radioaktiv markiertem TNF gemäss Beispiel 1, verwendet werden. Zur Gewinnung der TNF-BP können die generell zur Reinigung von Proteinen, insbesondere von Membranproteinen, verwendeten Methoden des Standes der Technik, wie beispielsweise Ionenaustausch-Chromatographie, Gelfiltration, Affinitätschromatographie, HPLC und SDS-PAGE verwendet werden. Besonders bevorzugte Methoden zur Herstellung von TNF-BP sind Affinitätschromatographie, insbesondere mit TNF- α als an die Festphase gebundenen Liganden und Immunaaffinitätschromatographie, HPLC und SDS-PAGE. Die Elution von mittels SDS-PAGE aufgetrennten TNF-BP Banden kann nach bekannten Methoden der Proteinchemie erfolgen, beispielsweise mittels Elektroelution nach Hunkapiller et al. [34], wobei nach heutigem Stand des Wissens die dort angegebenen Elektro-Dialysezeiten generell zu verdoppeln sind. Danach noch verbleibende Spuren von SDS können dann gemäss Bosserhoff et al. [50] entfernt werden.

[0011] Die so gereinigten TNF-BP können mittels der im Stand der Technik bekannten Methoden der Peptidchemie, wie beispielsweise N-terminale Aminosäuresequenzierung oder enzymatische wie chemische Peptidspaltung charakterisiert werden. Durch enzymatische oder chemische Spaltung erhaltene Fragmente können nach gängigen Methoden, wie beispielsweise HPLC, aufgetrennt und selbst wieder N-terminal sequenziert werden. Solche Fragmente, die selbst noch TNF binden, können mittels der obengenannten Nachweismethoden für TNF-BP identifiziert werden.

[0012] Ausgehend von der so erhältlichen Aminosäuresequenzinformation oder den in Figur 1 dargestellten DNA- wie Aminosäuresequenzen können unter Beachtung der Degeneration des genetischen Codes nach im Stand der Technik bekannten Methoden geeignete Oligonukleotide hergestellt werden [51]. Mittels dieser können dann wiederum nach bekannten Methoden der Molekularbiologie [42,43] cDNA- oder genomische DNA-Banken nach Klonen, die für TNF-BP kodierende Nukleinsäuresequenzen enthalten, abgesucht werden. Ausserdem können mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [49] cDNA-Fragmente kloniert werden, indem von zwei auseinanderliegenden, relativ kurzen Abschnitten der Aminosäuresequenz unter Beachtung des genetischen Codes vollständig degenerierte und in ihrer

Komplementarität geeignete Oligonucleotide als "Primer" eingesetzt werden, wodurch das zwischen diesen beiden Sequenzen liegende Fragment amplifiziert und identifiziert werden kann. Die Bestimmung der Nukleotidsequenz eines derartigen Fragmentes ermöglicht eine unabhängige Bestimmung der Aminosäure-Sequenz des Proteinfragments, für das es kodiert. Die mittels der PCR erhältlichen cDNA-Fragmente können ebenfalls, wie bereits für die Oligonukleotide selbst beschrieben, nach bekannten Methoden zum Aufsuchen von für TNF-BP kodierende Nukleinsäuresequenzen enthaltenden Klonen aus cDNA- bzw. genomische DNA-Banken verwendet werden. Solche Nukleinsäuresequenzen können dann nach bekannten Methoden sequenziert werden [42]. Aufgrund der so bestimmten wie der für bestimmte Rezeptoren bereits bekannten Sequenzen können solche Teilsequenzen, die für lösliche TNF-BP-Fragmente kodieren, bestimmt und mittels bekannter Methoden aus der Gesamtsequenz herausgeschnitten werden [42].

[0013] Die gesamte Sequenz oder solche Teilsequenzen können dann mittels bekannter Methoden in im Stand der Technik beschriebene Vektoren zu deren Vervielfältigung wie Expression in Prokaryoten integriert werden [42]. Geeignete Prokaryotische Wirtsorganismen stellen beispielsweise gram-negative wie gram-Positive Bakterien, wie beispielsweise E. coli Stämme, wie E. coli HB 101 [ATCC Nr. 33 694] oder E. coli W3110 [ATCC Nr. 27 325] oder B. subtilis Stämme dar.

[0014] Weiterhin können erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenzen in geeignete Vektoren zur Vermehrung wie Expression in eukaryotischen Wirtszellen, wie beispielsweise Hefe, Insekten- und Säugerzellen, mittels bekannter Methoden integriert werden. Expression solcher Sequenzen erfolgt bevorzugt in Säuger- wie Insektenzellen.

[0015] Ein typischer Expressionsvektor für Säugerzellen enthält ein effizientes Promotorelement, um eine gute Transkriptionsrate zu erzielen, die zu exprimierende DNA-Sequenz und Signale für eine effiziente Termination und Polyadenylierung des Transkripts. Weitere Elemente, die verwendet werden können, sind "Enhancer", welche zu nochmals verstärkter Transkription führen und Sequenzen, welche z.B. eine längere Halbwertszeit der mRNA bewirken können. Zur Expression von Nukleinsäuresequenzen, denen das endogene für ein Signalpeptid kodierende Sequenzstück fehlt, können Vektoren verwendet werden, die solche geeignete Sequenzen, die für Signalpeptide von anderen bekannten Proteinen kodieren, enthalten. Siehe beispielsweise der von Cullen, B.R. in Cell 46, 973-982 (1986) beschriebene Vektor pLJ268 oder auch bei Sharma, S. et al. in "Current Communications in Molecular Biology", ed. by Gething, M.J., Cold Spring Harbor Lab. (1985), Seiten 73-78.

[0016] Die meisten Vektoren, die für eine transiente Expression einer bestimmten DNA-Sequenz in Säugerzellen verwendet werden, enthalten den Replikationsursprung des SV40 Virus. In Zellen, die das T-Antigen des Virus exprimieren, (z.B. COS-Zellen), werden diese Vektoren stark vermehrt. Eine vorübergehende Expression ist aber nicht auf COS-Zellen beschränkt. Im Prinzip kann jede transfektierbare Säugerzelllinie hierfür verwendet werden. Signale, die eine starke Transkription bewirken können, sind z.B. die frühen und späten Promotoren von SV40, der Promoter and Enhancer des "major immediate-early" Gens des HCMV (humaner Cytomegalovirus), die LTRs ("long terminal repeats") von Retroviren, wie beispielsweise RSV, HIV und MMTV. Es können aber auch Signale von zellulären Genen, wie z.B. die Promotoren des Aktin- und Collagenase-Gens, verwendet werden.

[0017] Alternativ können aber auch stabile Zelllinien, die die spezifische DNA-Sequenz im Genom (Chromosom) integriert haben, erhalten werden. Hierzu wird die DNA-Sequenz zusammen mit einem selektierbaren Marker, z.B. Neomycin, Hygromycin, Dihydrofolat-Reduktase (dhfr) oder Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (hgpt) kotransfiziert. Die stabil ins Chromosom eingebaute DNA-Sequenz kann auch noch stark vermehrt werden. Ein geeigneter Selektionsmarker hierfür ist beispielsweise die Dihydrofolat-Reduktase (dhfr). Säugerzellen (z.B. CHO-Zellen), welche kein intaktes dhfr-Gen enthalten, werden hierbei nach erfolgter Transfektion mit steigenden Mengen von Methotrexat inkubiert. Auf diese Weise können Zelllinien erhalten werden, welche mehr als tausend Kopien der gewünschten DNA-Sequenz enthalten.

[0018] Säugerzellen, welche für die Expression verwendet werden können, sind z.B. Zellen der menschlichen Zelllinien Hela [ATCC CCL2] und 293 [ATCC CRL 1573], sowie 3T3- [ATCC CCL 163] und L-Zellen, z.B. [ATCC CCL 149], (CHO)-Zellen [ATCC CCL 61], BHK [ATCC CCL 10]-Zellen sowie die CV 1 [ATCC CCL 70]- und die COS-Zelllinien [ATCC CRL 1650, CRL 1651].

[0019] Geeignete Expressionsvektoren umfassen beispielsweise Vektoren wie pBC12MI [ATCC 67 109], pSV2dhfr [ATCC 37 146], pSVL [Pharmacia, Uppsala, Sweden], pRSVCat [ATCC 37 152] und pMSG [Pharmacia, Uppsala, Sweden]. Besonders bevorzugte Vektoren sind die in Beispiel 9 verwendeten Vektoren "pK19" und "pN123". Diese können aus den mit ihnen transformierten E. coli-Stämmen HB101(pK19) und HB101(pN123) nach bekannten Methoden isoliert werden [42]. Diese E. coli-Stämme wurden am 26. Januar 1990 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig, BRD unter DSM 5761 für HB101(pK19) und DSM 5764 für HB101(pN123) hinterlegt. Zur Expression der erfindungsgemäßen Proteine, eignen sich besonders pSV2 abgeleitete Vektoren wie beispielsweise von German, C. in "DNA Cloning" [Vol. II., ed. von Glover, D.M., IRL Press, Oxford, 1985] beschrieben. Besonders bevorzugte Vektoren sind die bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig, BRD hinterlegten und in der Europäischen Patentanmeldung Nr. 90107393.2 genau beschriebenen Vektoren pCD4-H_μ (DSM 5315), pCD4-H_{yl} (DSM 5314) und pCD4-H_{γ3} (DSM 5523). Besagte Europäische Patentschrift wie die in Beispiel 11 angegebenen äquivalenten Anmeldungen enthalten auch Angaben

bezüglich der weiteren Verwendung dieser Vektoren zur Expression von chimären Proteinen (siehe auch Beispiel 11) wie zur Konstruktion von Vektoren für die Expression von solchen chimären Proteinen mit anderen Immunglobulinanteilen.

[0020] Die Art und Weise wie die Zellen transfektiert werden hängt vom gewählten Expressions- und Vektorsystem ab. Eine Uebersicht über diese Methoden findet man z.B. bei Pollard et al., "DNA Transformation of Mammalian Cells" in "Methods in Molecular Biology" [Nucleic Acids Vol. 2, 1984, Walker, J.M., ed, Humana, Clifton, New Jersey]. Weitere Methoden findet man bei Chen und Okayama ["High-Efficiency Transformation of Mammalian Cells by Plasmid DNA", Molecular and Cell Biology 7, 2745-2752, 1987] und bei Felgner [Felgner et al., "Lipofectin: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure", Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84, 7413-7417, 1987].

[0021] Zur Expression in Insektenzellen kann das Baculovirus-Expressions-System, welches schon für die Expression einer Reihe von Proteinen erfolgreich eingesetzt worden ist (für eine Uebersicht siehe Luckow and Summers, Bio/Technology 6, 47-55, 1988), verwendet werden. Rekombinante Proteine können authentisch oder als Fusionsproteine hergestellt werden. Die so hergestellten Proteine können auch modifiziert, wie beispielsweise glykosyliert (Smith et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82, 8404-8408, 1987) sein. Für die Herstellung eines rekombinanten Baculovirus, der das gewünschte Protein exprimiert, verwendet man einen sogenannten "Transfervektor". Hierunter versteht man ein Plasmid, welches die heterologe DNA-Sequenz unter der Kontrolle eines starken Promoters, z.B. dem des Polyhedringens, enthält, wobei diese auf beiden Seiten von viralen Sequenzen umgeben ist. Besonders bevorzugte Vektoren sind die in Beispiel 10 verwendeten Vektoren "pN113", "pN119" und "pN124". Diese können aus den mit ihnen transformierten E. coli-Stämmen HB101(pN113), HB101(pN119) und HB101(pN124) nach bekannten Methoden isoliert werden [42]. Diese E. coli-Stämme wurden am 26. Januar 1990 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig, BRD, unter DSM 5762 für HB101(pN113), DSM 5763 für HB101(pN119) und DSM 5765 für HB101(pN124) hinterlegt. Der Transfervektor wird dann zusammen mit DNA des Wildtyp-Baculovirus in die Insektenzellen transfektiert. Die in den Zellen durch homologe Rekombination entstehenden rekombinanten Viren können dann nach bekannten Methoden identifiziert und isoliert werden. Eine Uebersicht über das Baculovirus-Expressionssystem und der dabei verwendeten Methoden findet man bei Luckow und Summers [52].

[0022] Exprimierte erfindungsgemäß Proteine können dann nach im Stand der Technik bekannten Methoden der Proteinchemie aus der Zellmasse oder den Kulturüberständen gereinigt werden.

[0023] Auf Grund der hohen Bindungsaffinität erfindungsgemässer TNF-BP für TNF (K_d -Werte in den Größenordnungen von 10^{-9} - 10^{-10} M) können diese oder Fragmente davon als Diagnostika zum Nachweis von TNF in Serum oder anderen Körperflüssigkeiten nach im Stand der Technik bekannten Methoden, beispielsweise in Festphasenbindungstests oder in Verbindung mit Anti-TNF-BP-Antikörpern in sogenannten "Sandwich"-Tests, eingesetzt werden.

[0024] Im übrigen können erfindungsgemässe TNF-BP einerseits zur Reinigung von TNF und andererseits zum Auffinden von TNF-Agonisten sowie TNF-Antagonisten nach im Stand der Technik bekannten Verfahren verwendet werden.

[0025] Die erfindungsgemässen Proteine sowie deren physiologisch verträgliche Salze, die nach im Stand der Technik bekannten Methoden hergestellt werden können, können auch zur Herstellung von pharmazeutischen Präparaten, vor allem solchen zur Behandlung von Krankheiten, bei deren Verlauf TNF involviert ist, verwendet werden. Dazu kann eine oder mehrere der genannten Verbindungen, falls wünschenswert bzw. erforderlich in Verbindung mit anderen pharmazeutisch aktiven Substanzen, mit den üblicherweise verwendeten festen oder flüssigen Trägermaterialien in bekannter Weise verarbeitet werden. Die Dosierung solcher Präparate kann unter Berücksichtigung der üblichen Kriterien in Analogie zu bereits verwendeten Präparaten ähnlicher Aktivität und Struktur erfolgen.

Referenz-Beispiel 1

Nachweis von TNF-bindenden Proteinen

[0026] Die TNF-BP wurden in einem Filtertest mit humanem radio-jodiertem 125 I-TNF nachgewiesen. TNF (46,47) wurde mit Na^{125}I (IMS40, Amersham, Amersham, England) und Iodo-Gen (#28600, Pierce Eurochemie, Oud-Beijerland, Niederlande) nach Fraker und Speck [48] radioaktiv markiert. Zum Nachweis der TNF-BP wurden isolierte Membranen der Zellen oder ihre solubilisierten, angereicherten und gereinigten Fraktionen auf angefeuchtete Nitrocellulose-Filter (0.45 μ , BioRad, Richmond, California, USA) aufgetragen. Die Filter wurden dann in Pufferlösung mit 1% entfettetem Milchpulver blockiert und anschliessend mit $5 \cdot 10^5$ cpm/ml 125 I-TNF α (0.3 - $1.0 \cdot 10^8$ cpm/ μ g) in zwei Ansätzen mit und ohne Beigabe von 5 μ g/ml nicht-markiertem TNF α inkubiert, gewaschen und luftgetrocknet. Die gebundene Radioaktivität wurde autoradiographisch semiquantitativ nachgewiesen oder in einem γ -Counter gezählt. Die spezifische 125 I-TNF- α -Bindung wurde nach Korrektur für unspezifische Bindung in Anwesenheit von unmarkiertem TNF- α im Ueberschuss ermittelt. Die spezifische TNF-Bindung im Filtertest wurde bei verschiedenen TNF-Konzentrationen gemessen und nach Scatchard analysiert [33], wobei ein K_d -Wert von $\sim 10^{-9}$ - 10^{-10} M ermittelt wurde.

Referenz-Beispiel 2Zellextrakte von HL-60-Zellen

5 [0027] HL60 Zellen [ATCC-Nr. CCL 240] wurden in experimentellem Labormasstab in einem RPMI 1640-Medium [GIBCO-Katalog Nr. 074-01800], das noch 2 g/l NaHCO_3 und 5% fötales Kälberserum enthielt, in einer 5% CO_2 -Atmosphäre kultiviert und anschliessend zentrifugiert.

[0028] Zum Erzielen hoher Zelldichten in technischem Masstab wurde folgendermassen verfahren. Die Züchtung wurde in einem 75 l Airlifftermenter (Fa. Chemap, Schweiz) mit 58 l Arbeitsvolumen durchgeführt. Hierfür wurde das
 10 Kassettenmembransystem "PROSTAK" (Millipore, Schweiz) mit einer Membranfläche von $0,32 \text{ m}^2$ (1 Kassette) in den äusseren Zirkulationskreislauf integriert. Das Kulturmedium (siehe Tabelle 1) wurde mit einer Watson-Marlow Pumpen TYP 603U, mit 5 l/min. umgepumpt. Nach einer Dampfsterilisation der Anlagen wobei das "PROSTAK" System im Autoklaven separat sterilisiert wurde, wurde die Fermentation mit wachsenden HL-60 Zellen aus einem 20 l Airlifftermenter (Chemap) gestartet. Die Zellzüchtung im Impff fermenter erfolgte im konventionellen Batchverfahren in dem Medium
 15 gemäss Tabelle 1 und einem Startzelltiter von 2×10^5 Zellen/ml. Nach 4 Tagen wurde der HL60 Ansatz mit einem Titer von $4,9 \times 10^6$ Zellen/ml in den 75 l Fermenter überführt. Der pH-Wert wurde bei 7,1 und der pO_2 Wert bei 25% Sättigung gehalten, wobei der Sauerstoffeintrag durch eine mikroporöse Fritte erfolgte. Nach anfänglicher Batchfermentation wurde am 2. Tag die Perfusion bei einem Zelltiter von 4×10^6 Zellen/ml mit 30 l Mediumsaustausch Pro Tag gestartet. Auf der Filtratseite der Membran wurde das konditionierte Medium abgezogen und durch den Zulauf von frischem
 20 Medium ersetzt. Das Zulaufmedium wurde wie folgt verstärkt: Primatone von 0,25% auf 0,35%, Glutamin von 5 mM auf 6 mM und Glucose von 4 g/l auf 6 g/l. Die Perfusionsrate wurde dann am 3. und 4. Tag auf 72 l Medium/Tag und am 5. Tag auf 100 l Medium/Tag erhöht. Nach 120 Stunden der kontinuierlichen Züchtung wurde die Fermentation beendet. Unter den gegebenen Fermentationsbedingungen erfolgte exponentielles Zellwachstum bis 40×10^6 Zellen/ml. Die Verdopplungszeit der Zellpopulation betrug bis 10×10^6 Zellen/ml 20-22 Stunden und stieg dann mit zunehmender Zelldichte auf 30-36 Stunden an. Der Anteil der lebenden Zellen lag während der gesamten Fermentationszeit bei 90-95%. Der HL-60 Ansatz wurde dann im Fermenter auf ca. 12°C heruntergekühlt und die Zellen durch Zentrifugation (Beckman-Zentrifuge [Modell J-6B, Rotor JS], 3000 rpm, 10 min., 4°C) geerntet.

Tabelle 1HL-60 Medium

Komponenten	Konzentrationen
	mg/l
CaCl_2 (wasserfrei)	112,644
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	20
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$0,498 \cdot 10^{-3}$
$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0,02
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1668
KCl	336,72
KNO_3	0,0309
MgCl_2 (wasserfrei)	11,444

	MgSO ₄ (wasserfrei)	68,37
	NaCl	5801,8
5	Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei)	188,408
	NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	75
	Na ₂ SeO ₃ •5H ₂ O	9,6•10 ⁻³
10	ZnSO ₄ •7H ₂ O	0,1726
	D-Glucose	4000
	Glutathion (red.)	0,2
15	Hepes-Puffer	2383,2
	Hypoxanthin	0,954
	Linolsäure	0,0168
	Liponsäure	0,042
20	Phenolrot	10,24
	Putrescin 2HCl	0,0322
	Na-Pyruvat	88
25	Thymidin	0,146
	Biotin	0,04666
	D-Ca-Pantothenat	2,546
	Cholinchlorid	5,792
30	Folsäure	2,86
	i-Inositol	11,32
	Niacinamid	2,6
35	Nicotinamid	0,0074
	para-Aminobenzoessäure	0,2
	Pyridoxal HCl	2,4124
	Pyridoxin HCl	0,2
40	Riboflavin	0,2876
	Thiamin HCl	2,668
	Vitamin B ₁₂	0,2782
45	L-Alanin	11,78
	L-Asparaginsäure	10
	L-Asparagin H ₂ O	14,362
50	L-Arginin	40
	L-Arginin HCl	92,6
	L-Aspartat	33,32

55

	L-Cystin 2HCl	62,04
5	L-Cystein HCl•H ₂ O	7,024
	L-Glutaminsäure	36,94
	L-Glutamin	730
	L-Glycin	21,5
10	L-Histidin	3
	L-Histidin HCl•H ₂ O	27,392
	L-Hydroxyprolin	4
15	L-Isoleucin	73,788
	L-Leucin	75,62
	L-Lysin HCl	102,9
20	L-Methionin	21,896
	L-Phenylalanin	43,592
	L-Prolin	26,9
25	L-Serin	31,3
	L-Threonin	53
	L-Tryptophan	11,008
	L-Tyrosin•2Na	69,76
30	L-Valin	62,74
	Penicillin/Streptomycin	100 U/ml
35	Insulin (human)	5 µg/ml
	Tranferrin (human)	15 µg/ml
	Rinderserumalbumin	67 µg/ml
40	Primatone RL (Sheffield Products, Norwich NY, USA)	0,25%
	Pluronic F68	
45	(Serva, Heidelberg, BRD)	0,01%
	Fötales Kälberserum	0,3-3%

50 [0029] Das Zentrifugat wurde mit isotonem Phosphatpuffer (PBS; 0,2 g/l KCl, 0,2 g/l KH₂PO₄, 8,0 g/l NaCl, 2,16 g/l Na₂HPO₄ • 7H₂O), der mit 5% Dimethylformamid, 10 mM Benzamidin, 100 E/ml Aprotinin, 10 µM Leupeptin, 1 µM Pepstatin, 1 mM o-Phenanthrolin, 5 mM Jodacetamid, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid versetzt war (im folgenden als PBS-M bezeichnet), gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden bei einer Dichte von 2,5 • 10⁸ Zellen/ml in PBS-M mit Triton X-100 (Endkonzentration 1,0%) extrahiert. Der Zelleextrakt wurde durch Zentrifugation geklärt (15'000 x g, 1 Stunde; 100'000 x g, 1 Stunde).

Referenz-Beispiel 3Herstellung von monoklonalen (TNF-BP)-Antikörpern

- 5 **[0030]** Ein gemäss Referenz-Beispiel 2 erhaltener Zentrifugationsüberstand aus Kultivierung von HL60-Zellen im experimentellen Labormasstab wurde im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt. Der verdünnte Ueberstand wurde bei 4°C auf eine Säule aufgetragen (Flussrate: 0,2 ml/min.), die 2 ml Affigel 10 enthielt (Bio Rad Katalog Nr. 153-6099), an das 20 mg rekombinantes humanes TNF- α [Pennica, D. et al. (1984) Nature 312, 724; Shirai, T. et al. (1985) Nature 313, 803; Wang, A.M. et al. (1985) Science 228, 149] gemäss den Empfehlungen des Herstellers gekoppelt worden war. Die
- 10 Säule wurde bei 4°C und einer Durchflussrate von 1 ml/min zuerst mit 20 ml PBS, das 0,1% Triton X 114 enthielt und danach mit 20 ml PBS gewaschen. So angereichertes TNF-BP wurde bei 22°C und einer Flussrate von 2 ml/min mit 4 ml 100 mM Glycin, pH 2.8, 0,1% Decylmaltosid eluiert. Das Eluat wurde in einer Centricon 30 Einheit [Amicon] auf 10 μ l konzentriert.
- [0031]** 10 μ l dieses Eluates wurden mit 20 μ l vollständigem Freundschens Adjuvans zu einer Emulsion gemischt. Je 10 μ l der Emulsion wurden gemäss dem von Holmdahl, R. et al. [(1985), J. Immunol. Methods 83 379] beschriebenen Verfahren an den Tagen 0, 7 und 12 in eine hintere Fusspfote einer narkotisierten Balb/c-Maus injiziert.
- [0032]** Am Tag 14 wurde die immunisierte Maus getötet, der popliteale Lymphknoten herausgenommen, zerkleinert und in Iscove's Medium (IMEM, GIBCO Katalog Nr. 074-2200), das 2 g/l NaHCO₃ enthielt, durch wiederholtes Pipettieren suspendiert. Gemäss einem modifizierten Verfahren von De St.Groth und Scheidegger [J. Immunol. Methods (1980), 35, 1] wurden 5×10^7 Zellen des Lymphknotens mit 5×10^7 PAI Maus-Myelomazellen (J.W. Stocker et al., Research Disclosure, 217, Mai 1982, 155-157), die sich in logarithmischem Wachstum befanden, fusioniert. Die Zellen wurden gemischt, durch Zentrifugation gesammelt und durch leichtes Schütteln in 2 ml 50% (v/v) Polyethylenglycol in IMEM bei Raumtemperatur resuspendiert und durch langsame Zugabe von 10 ml IMEM während 10 Minuten vorsichtigen Schüttelns verdünnt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation gesammelt und in 200 ml vollständigem
- 25 Medium [IMEM + 20% fötales Kälberserum, Glutamin (2,0 mM), 2-Mercaptoethanol (100 μ M), 100 μ M Hypoxanthine, 0,4 μ M Aminopterin und 16 μ M Thymidine (HAT)] resuspendiert. Die Suspension wurde auf 10 Gewebekulturschalen, die jeweils 96 Vertiefungen enthielten, verteilt und ohne Wechsel des Mediums bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 98% 11 Tage lang inkubiert.
- [0033]** Die Antikörper zeichnen sich aus durch ihre inhibierende Wirkung auf die TNF-Bindung an HL60-Zellen oder durch ihre Bindung an Antigen im Filtertest gemäss Referenz-Beispiel 1. Zum Nachweis der biologischen Aktivität von anti(TNF-BP)-Antikörpern wurde folgendermassen verfahren: 5×10^6 HL60 oder U937-Zellen wurden in vollständigem RPMI 1640 Medium zusammen mit affinitätsgereinigten monoklonalen anti-(TNF-BP)-Antikörpern oder Kontrollantikörpern (d.h. solchen, die nicht gegen TNF-BP gerichtet sind) in einem Konzentrationsbereich von 1 ng/ml bis 10 μ g/ml inkubiert. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C wurden die Zellen durch Zentrifugation gesammelt und mit 4,5
- 35 ml PBS bei 0°C gewaschen. Sie wurden in 1 ml vollständigem RPMI 1640 Medium (Referenz-Beispiel 2), das zusätzlich 0,1% Natriumazid und ¹²⁵I-TNF α (10⁶ cpm/ml) mit oder ohne Beigabe von unmarkiertem TNF α (s.o.) enthielt, resuspendiert. Die spezifische Radioaktivität des ¹²⁵I-TNF α betrug 700 Ci/mmol. Die Zellen wurden 2 Stunden bei 4°C inkubiert, gesammelt und 4 mal mit 4,5 ml PBS, das 1% BSA und 0,001% Triton X 100 (Fluka) enthielt, bei 0°C gewaschen. Die an die Zellen gebundene Radioaktivität wurde in einem γ -Scintillations-zähler gemessen. In einem vergleichbaren Experiment wurde die zellgebundene Radioaktivität von Zellen, die nicht mit anti-(TNF-BP)-Antikörpern
- 40 behandelt worden waren, bestimmt (ungefähr 10 000 cpm/ 5×10^6 Zellen).

Referenz-Beispiel 445 Affinitätschromatographie

- [0034]** Für die weitere Reinigung wurden jeweils ein gemäss Referenz-Beispiel 3 erhaltener monoklonaler anti-(55 kD TNF-BP)-Antikörper (2,8 mg/ml Gel), TNF α (3,0 mg/ml Gel) und Rinderserumalbumin (BSA, 8,5 mg/ml Gel) gemäss den Vorschriften des Herstellers kovalent an CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Pharmacia, Uppsala, Schweden) gekoppelt. Der gemäss Referenz-Beispiel 2 erhaltene Zelleextrakt wurde über die so hergestellten und in der folgenden Reihenfolge hintereinandergeschalteten Säulen geleitet: BSA-Sepharose-Vorsäule, Immunaффinitätssäule [Anti-(55 kD-TNF-BP)-Antikörper], TNF α -Ligand-Affinitätssäule. Nach vollständigem Auftrag wurden die beiden letztgenannten Säulen abgetrennt und einzeln für sich mit je 100 ml der folgenden Pufferlösungen gewaschen: (1) PBS, 1,0% Triton X-100, 10 mM Benzamidin, 100 E/ml Aprotinin; (2) PBS, 0,1% Triton X-100, 0,5M NaCl, 10 mM ATP, 10 mM Benzamidin, 100 E/ml Aprotinin; und (3) PBS, 0,1% Triton X-100, 10 mM Benzamidin, 100 E/ml Aprotinin. Sowohl die Immun- als auch die TNF α -Ligand-Affinitätssäule wurden dann mit 100 mM Glycin pH 2.5, 100 mM NaCl, 0,2% Decylmaltoside, 10 mM Benzamidin, 100 E/ml Aprotinin jede für sich eluiert. Die im Filtertest gemäss Beispiel 1 aktiven Fraktionen jeder Säule wurden danach jeweils vereint und mit 1M Tris pH 8,0 neutralisiert.

[0035] Die so vereinten TNF-BP-aktiven Fraktionen der ImmunAffinitätschromatographie einerseits und der TNF α -LigandAffinitätschromatographie andererseits wurden zur weiteren Reinigung nochmals auf je eine kleine TNF α -Ligand-Affinitätssäule aufgetragen. Danach wurden diese beiden Säulen mit je 40 ml von (1) PBS, 1,0% Triton X-100, 10 mM Benzamidin, 100 E/ml Aprotinin, (2) PBS, 0,1% Triton X-100, 0,5M NaCl, 10 mM ATP, 10mM Benzamidin, 100 E/ml Aprotinin, (3) PBS, 0,1% Triton X-100, (4) 50 mM Tris PH 7.5, 150 mM NaCl, 1,0% NP-40, 1,0% Desoxycholat, 0,1% SDS, (5) PBS, 0,2% Decylmaltosid gewaschen. Anschliessend wurden die Säulen mit 100 mM Glycin pH 2.5, 100 mM NaCl, 0,2% Decylmaltosid eluiert. Fraktionen von 0,5 ml von jeder Säule wurden für sich gesammelt und die gemäss Filtertest (Referenz-Beispiel 1) aktiven Fraktionen von jeder Säule jeweils für sich vereint und in einer Centri-con-Einheit (Amicon, Molekulargewichts-Ausschluss 10'000) aufkonzentriert.

Referenz-Beispiel 5

Auftrennung mittels HPLC

[0036] Die gemäss Referenz-Beispiel 4 erhaltenen aktiven Fraktionen wurden gemäss ihrer unterschiedlichen Herkunft (Immun- bzw. Ligand-Affinitätschromatographie) jeweils für sich auf C1/C8 Umkehrphasen-HPLC-Säulen (ProRPC, Pharmacia, 5x20 mm), die mit 0,1% Trifluoressigsäure, 0,1% Octylglucosid equilibriert worden waren, aufgetragen. Die Säulen wurden dann mit einem linearen Acetonitril-Gradienten (0-80%) im gleichen Puffer bei einem Fluss von 0.5 ml/min eluiert. Fraktionen von 1,0 ml wurden von jeder Säule gesammelt und die aktiven Fraktionen von jeder Säule für sich vereint (Nachweis gemäss Referenz-Beispiel 1).

Referenz-Beispiel 6

Auftrennung mittels SDS-PAGE

[0037] Die gemäss Referenz-Beispiel 5 erhaltenen und gemäss Filtertest (Referenz-Beispiel 1) aktiven Fraktionen wurden durch SDS-PAGE gemäss [34] weiter aufgetrennt. Dazu wurden die Proben in SDS-Probenpuffer während 3 Minuten auf 95°C erhitzt und anschliessend auf einem 12% Acrylamid-Trenngel mit einem 5%igen Sammelgel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Referenz zur Bestimmung der scheinbaren Molekulargewichte auf dem SDS-PAGE Gel wurden die folgenden Eichproteine verwendet: Phosphorylase B (97,4 kD), BSA (66,2 kD), Ovalbumin (42,7 kD), Carboanhydrase (31,0 kD), Soya Trypsin-Inhibitor (21,5 kD) und Lysozym (14,4 kD).

[0038] Unter den genannten Bedingungen wurden für Proben, die gemäss Referenz-Beispiel 4 durch TNF α -Ligandenaffinitätschromatographie von Immunaaffinitätschromatographieeluat erhalten und durch HPLC gemäss Referenz-Beispiel 5 weiter aufgetrennt worden waren, zwei Banden von 55 kD und 51 kD sowie drei schwächere Banden von 38 kD, 36 kD und 34 kD erhalten. Diese Banden wurden in einem Mini Trans Blot System (BioRad, Richmond, California, USA) elektrophoretisch während 1 Stunde bei 100 V in 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol auf eine PVDF-Membran (Immobilon, Millipore, Bedford, Mass. USA) transferiert. Danach wurde die PVDF-Membran entweder mit 0,15% Serva-Blau (Serva, Heidelberg, BRD) in Methanol/Wasser/Eisessig (50/40/10 Volumenteile) auf Protein gefärbt oder mit entfettetem Milchpulver blockiert und anschliessend zum Nachweis von Banden mit TNF-BP-Aktivität mit ¹²⁵I-TNF α gemäss den in Beispiel 1 beschriebenen Filtertestbedingungen inkubiert. Dabei zeigte sich, dass alle in der Proteinfärbung zur Darstellung gelangten Banden spezifisch TNF α banden. Alle diese Banden banden im Western Blot nach Towbin et al. [38] auch den gemäss Referenz-Beispiel 3 hergestellten monoklonalen Anti-55kD-TNF-BP-Antikörper. Dabei wurde ein gemäss dem in Referenz-Beispiel 1 beschriebenen Verfahren mit Na¹²⁵I radioaktiv markierter, affinitätsgereinigter (Mausimmunglobulin-Sepharose-4B-Affinitätssäule) Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin-Antikörper zum autoradiographischen Nachweis dieses Antikörpers eingesetzt.

Referenz-Beispiel 7

Aminosäuresequenzanalyse

[0039] Zur Aminosäuresequenzanalyse wurden die gemäss Referenz-Beispiel 5 erhaltenen und gemäss Filtertest (Referenz-Beispiel 1) aktiven Fraktionen mittels der in Referenz-Beispiel 6 beschriebenen, nun jedoch reduzierenden, SDS-PAGE Bedingungen (SDS-Probenpuffer mit 125 mM Dithiothreitol) aufgetrennt. Es wurden die gleichen Banden wie gemäss Referenz-Beispiel 6 gefunden, die allerdings auf Grund der reduzierenden Bedingungen der SDS-PAGE im Vergleich zu Referenz-Beispiel 6 alle um etwa 1-2 kD höhere Molekulargewichte zeigten. Diese Banden wurden dann gemäss Referenz-Beispiel 6 auf PVDF-Membranen übertragen und mit 0,15% 35 Serva-Blau in Methanol/Wasser/Eisessig (50/40/10 Volumenteile) während 1 Minute gefärbt, mit Methanol/Wasser/Eisessig (45/48/7 Volumenteile) entfärbt, mit Wasser gespült, luftgetrocknet und danach ausgeschnitten. Bei sämtlichen Schritten wurden zur Vermeidung

5 dung von N-terminaler Blockierung die von Hunkapiller [34] angegebenen Bedingungen eingehalten. Zunächst wurden die gereinigten TNF-BP unverändert zur Aminosäuresequenzierung eingesetzt. Um zusätzliche Sequenzinformation zu erhalten, wurden die TNF-BP nach Reduktion und S-Carboxymethylierung [Jones, B.N. (1986) in "Methods of Protein Microcharacterisation", J.E. Shively, ed., Humana Press, Clifton NJ, 124-125] mit Bromcyan (Tarr, G.E. in "Methods of Protein Microcharacterisation", 165-166, op.cit.), Trypsin und/oder Proteinase K gespalten und die Peptide mittels HPLC nach bekannten Methoden der Proteinchemie aufgetrennt. So vorbereitete Proben wurden dann in einem automatisierten Gasphasen-Mikrosequenzier-Gerät (Applied Biosystems Modell 470A, ABI, Foster City, Calif., USA) mit einem on-line nachgeschalteten automatisierten HPLC PTH-Aminosäureanalysator (Applied Biosystems Modell 120, ABI s.o.) sequenziert, wobei die folgenden Aminosäuresequenzen bestimmt wurden:

10 1., Für die 55 kD-Bande (gemäß nichtreduzierender SDS-PAGE):

Leu-Val-Pro-His-Leu-Gly-Asp-Arg-Glu-Lys-Arg-Asp-Ser-Val-Cys-Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-X-Asn-Ser-Ile,
und

15 Ser-Thr-Pro-Glu-Lys-Glu-Gly-Glu-Leu-Glu-Gly-Thr-Thr-Thr-Lys

wobei X für einen Aminosäurerest steht, der nicht bestimmt werden konnte.

2., Für die 51 kD und die 38 kD-Banden (gemäß nichtreduzierender SDS-PAGE):

Leu-Val-Pro-His-Leu-Gly-Asp-Arg-Glu

20 Referenz-Beispiel 8

Bestimmung von Basen-Sequenzen von komplementärer DNA (cDNA)

25 **[0040]** Ausgehend von der Aminosäuresequenz gemäß Formel IA wurden unter Berücksichtigung des genetischen Codes zu den Aminosäureresten 2-7 und 17-23 entsprechende, vollständig degenerierte Oligonucleotide in geeigneter Komplementarität synthetisiert ("sense" und "antisense" Oligonucleotide). Totale zelluläre RNA wurde aus HL60-Zellen isoliert [42, 43], und der erste cDNA-Strang durch Oligo-dT-Priming oder durch Priming mit dem "anti-sense" Oligonucleotid mittels eines cDNA-Synthese-Kits (RPN 1256, Amersham, Amersham, England) gemäß der
30 Anleitung des Herstellers synthetisiert. Dieser cDNA-Strang und die beiden synthetisierten degenerierten "sense" und "anti-sense" Oligonucleotide wurden in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA) gemäß Anleitung des Herstellers dazu verwendet, die für die Aminosäure-Reste 8-16 (Formel IA) codierende Basensequenz als cDNA-Fragment zu synthetisieren. Die Basensequenz dieses cDNA-Fragmentes lautet: 5'-AGGGAGAA-GAGAGATAGTGTGTGTGCCCC-3'. Dieses cDNA-Fragment wurde als Probe verwendet, um nach bekannten Verfahren
35 einen für das 55 kD TNF-BP codierenden cDNA-Klon in einer λ t11-cDNA-Genbank von menschlicher Placenta zu identifizieren (42,43). Dieser Klon wurde dann nach üblichen Methoden aus dem λ -Vektor geschnitten und in die Plasmide pUC18 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) und pUC19 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) und in die M13mp18/M13mp19 Bacteriophagen (Pharmacia, Uppsala, Sweden) kloniert (42,43). Die Nukleotidsequenz dieses cDNA-Klons wurde mit einem Sequenase-Kit (U.S. Biochemical, Cleveland, Ohio, USA) nach den Angaben des Herstellers bestimmt. Die Nukleotidsequenz und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz für das 55 kD TNF-BP und dessen Signalpeptid (Aminosäure "-28" bis Aminosäure "0") ist in Figur 1 mittels der im Stand der Technik üblichen
40 Abkürzungen für Basen wie Aminosäuren dargestellt. Aus Sequenzvergleichen mit anderen, bereits bekannten Rezeptorproteinsequenzen lassen sich ungefähr 180 Aminosäuren enthaltende N-terminale wie 220 Aminosäure enthaltende C-terminale Domänen, die von einer nach den Sequenzvergleichen typischen Transmembran-Region von 19 Aminosäuren (in Figur 1 unterstrichen) getrennt werden, bestimmen. Hypothetische Glykosylierungsstellen sind in Figur 1 durch Sterne über der entsprechenden Aminosäure gekennzeichnet.

Referenz-Beispiel 9

50 Expression in COS 1-Zellen

[0041] Für die Expression in COS-Zellen wurden Vektoren ausgehend von dem Plasmid "pN11" konstruiert. Das Plasmid "PN11" enthält den effizienten Promotor und Enhancer des "major immediate-early" Gens des menschlichen Cytomegalovirus ("HCMV"; Boshart et al., Cell 41, 521-530, 1985). Hinter dem Promotor befindet sich eine kurze DNA-Sequenz, welche mehrere Restriktionsschnittstellen enthält, die nur einmal im Plasmid vorkommen ("Polylinker"), u.a. die Schnittstellen für HindIII, Ball, BamHI und PvuII (siehe Sequenz).

PvuII

5' - AAGCTTGGCCAGGATCCAGCTGACTGACTGATCGCGAGATC - 3'
 3' - TTCGAACCGGTCCTAGGTCGACTGACTGACTAGCGCTCTAG - 5'

Hinter diesen Schnittstellen befinden sich drei Translations-Stopcodons in allen drei Leserastern. Hinter der Polylinkersequenz befindet sich das 2. Intron und das Polyadenylierungssignal des Präproinsulins der Ratte (Lomedico et al., Cell 18, 545-558, 1979). Das Plasmid enthält ferner den Replikationsursprung des SV40 Virus sowie ein Fragment aus pBR322, das E. coli-Bakterien Ampicillin-Resistenz verleiht und die Replikation des Plasmids in E. coli ermöglicht.

[0042] Zur Konstruktion des Expressionsvektors "pN123" wurde dieses Plasmid "pN11" mit der Restriktionsendonuklease PvuII geschnitten und anschliessend mit alkalischer Phosphatase behandelt. Der dephosphorylierte Vektor wurde danach aus einem Agarosegel isoliert (V1). Die 5'-überhängenden Nukleotide des EcoRI-geschnittenen 1,3kb-Fragments der 55 kD TNF-BP-cDNA (siehe Referenz-Beispiel 8) wurden mit Hilfe von Klenow-Enzym aufgefüllt. Anschliessend wurde dieses Fragment aus einem Agarosegel isoliert (F1). Danach wurden V1 und F1 mittels T4-Ligase miteinander verbunden. E. coli HB101-Zellen wurden dann mit diesem Ligierungsansatz nach bekannten Methoden [42] transformiert. Mit Hilfe von Restriktionsanalysen und DNA-Sequenzierung nach bekannten Methoden [42] wurden Transformanten identifiziert, die mit einem Plasmid transformiert worden waren, welches das 1,3kb EcoRI-Fragment der 55 kD TNF-BP-cDNA in der für die Expression über den HCMV-Promotor korrekten Orientierung enthielt. Dieser Vektor erhielt die Bezeichnung "pN123".

[0043] Zur Konstruktion des Vektors "pK19" wurde folgendermassen verfahren. Ein DNA-Fragment, welches nur die für den extrazellulären Teil des 55 kD TNF-BP codierende cDNA enthält (Aminosäuren -28 bis 182 gemäss Figur 1) wurde mittels PCR-Technologie erhalten (Saiki et al., Science 230, 1350-1354, 1985, siehe auch Referenz-Beispiel 8). Die folgenden Oligonukleotide wurden, um die für den extrazellulären Teil des 55 kD TNF-BP codierende cDNA aus "pN123" zu amplifizieren, verwendet:

BamHI

5' - CACAGGGATCCATAGCTGTCTGGCATGGGCCTCTCCAC - 3'

ASP718

3' - CGTGACTCCTGAGTCCGTGGTGTATTATCTCTAGACCATGGCCC - 5'

[0044] Durch diese Oligonukleotide wurden ebenfalls zwei Stopkodons der Translation hinter Aminosäure 182 eingeführt. Das so amplifizierte DNA-Fragment wurde mit BamHI und Asp718 geschnittene die hierbei entstandenen überstehenden Enden mit Hilfe des Klenow-Enzyms aufgefüllt und dieses Fragment anschliessend aus einem Agarosegel isoliert (F2). F2 wurde dann mit V1 ligiert und der gesamte Ansatz zur Transformation von E. coli HB101, wie bereits beschriebene verwendet. Transformanten, die mit einem Plasmid transformiert worden waren, welches das DNA-Fragment in der für die Expression über den HCMV-Promotor korrekten Orientierung enthielten, wurden mittels DNA-Sequenzierung (s.o.) identifiziert. Das daraus isolierte Plasmid erhielt die Bezeichnung "pK19".

[0045] Transfektion der COS-Zellen mit den Plasmiden "pN123" oder "pK19" wurde nach der von Felgner et al. veröffentlichten Lipofections-Methode (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413-7417, 1987) durchgeführt. 72 Stunden nach erfolgter Transfektion wurden die mit "pN123" transfizierten Zellen nach bekannten Methoden mit ¹²⁵I-TNF α auf Bindung analysiert. Das Resultat der Scatchard-Analyse [Scatchard, G., Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660, 1949] der so erhaltenen Bindungsdaten (Figur 2A) ist in Figur 2B dargestellt. Die Kulturüberstände der mit "pK19" transfizierten Zellen wurden in einem "Sandwich"-Test untersucht. Dazu wurden PVC-Microtiterplatten (Dynatech, Arlington, VA, USA) mit 100 μ l/Loch eines Kaninchen-anti-Maus Immunglobulins (10 μ g/ml PBS) sensibilisiert. Anschliessend wurde die Platte gewaschen und mit einem anti-55 kD TNF-BP-Antikörper, der gemäss Referenz-Beispiel 3 durch seine Antigenbindung nachgewiesen und isoliert wurde, der aber die TNF-Bindung an Zellen nicht inhibiert, inkubiert (3 Stunden, 20°C). Die Platte wurde dann wieder gewaschen und über Nacht bei 4°C mit 100 μ l/Loch der Kulturüberstände (1:4 verdünnt mit 1% entfetteter Milchpulver enthaltendem Puffer A: 50 mM Tris/HCl pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,02% Na-Azid) inkubiert. Die Platte wurde entleert und mit ¹²⁵I-TNF α enthaltendem Puffer A (10⁶ cpm/ml, 100 μ l/Loch) mit oder ohne Zusatz von 2 μ g/ml unmarkiertem TNF während 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Platte 4 mal mit PBS gewaschen, die einzelnen Löcher wurden ausgeschnitten und in einem γ -Zähler gemessen. Die Resultate von 5 paral-

lenen Transfektionen (Säulen # 2, 3, 4, 6 und 7), von zwei Kontroll-Transfektionen mit dem pN11-Vektor (Säulen # 1, 5) und von einer Kontrolle mit HL60-Zell-Lysat (Säule # 8) sind in Figur 3 dargestellt.

Referenz-Beispiel 10

Expression in Insektenzellen

[0046] Für die Expression in einem Baculovirus-Expressionssystem wurde von dem Plasmid "pVL941" (Luckow und Summers, 1989, "High Level Expression of Nonfused Foreign Genes with Autographa californica Nuclear Polyhedrosis virus Expression Vectors", Virology 170, 31-39) ausgegangen und dieses folgendermassen modifiziert. Es wurde die einzige EcoRI-Restriktionsschnittstelle in "pVL941" entfernt, indem das Plasmid mit EcoRI geschnitten und die überstehenden 5'-Enden mit Klenow-Enzym aufgefüllt wurden. Das hieraus erhaltene Plasmid pVL941/E- wurde mit BamHI und Asp718 verdaut und der Vektorrumpf anschliessend aus einem Agarosegel isoliert. Dieses Fragment wurde mit einem synthetischen Oligonukleotid der folgenden Sequenz ligiert:

	BamHI	EcoRI	Asp718	
5'	-	GATCCAGAAATTCATAATAG		- 3'
3'		GTCTTAAGTATTATCCATG		- 5'

[0047] E. coli HB101 wurde mit dem Ligierungsansatz transformiert und Transformanten, die ein Plasmid enthielten, in welches das Oligonukleotid korrekt eingebaut worden war, wurden durch Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung nach bekannten Methoden (s.o.) identifiziert; dieses Plasmid wurde "PNR704" genannt. Zur Konstruktion des Transfervektors "pN113" wurde dieses Plasmid "pNR704" mit EcoRI geschnitten, mit alkalischer Phosphatase behandelt und der so erzeugte Vektorrumpf (V2) anschliessend aus einem Agarosegel isoliert. Das wie oben mit EcoRI geschnittene 1,3 kb-Fragment der 55 kD TNF-BP-cDNA wurde mit Fragment V2 ligiert. Mit diesem Ligierungsansatz erhaltene Transformanten, die ein Plasmid enthielten, welches das cDNA-Insert in der korrekten Orientierung für die Expression über den Polyhedrinpromotor enthielten, wurden identifiziert (s.o.). Der daraus isolierte Vektor erhielt die Bezeichnung "PN113".

[0048] Zur Konstruktion des Transfervektors "pN119" wurde folgendermassen vorgegangen. Das 1,3 kb EcoRI/EcoRI-Fragment der 55 kD TNF-BP cDNA in dem "pUC19"-Plasmid (siehe Beispiel 8) wurde mit BanI verdaut und mit dem folgenden synthetischen Oligonukleotid ligiert:

	BanI	Asp718	
5'	-	GCACCACATAATAGAGATCTGGTACCGGGAA	- 3'
3'		GTGTATTATCTCTAGACCATGGCCC	- 5'

[0049] Mit dem obigen Adaptor werden zwei Stopcodons der Translation hinter Aminosäure 182 und eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease Asp718 eingebaut. Nach erfolgter Ligation wurde der Ansatz mit EcoRI und Asp718 verdaut und das partielle 55 kD TNF-BP-Fragment (F3) isoliert. Weiterhin wurde das ebenfalls mit Asp718 und EcoRI geschnittene Plasmid "pNR704" mit F3 ligiert und der Ligierungsansatz in E. coli HB101 transformiert. Die Identifikation der Transformanten, welche ein Plasmid enthielten, in das die partielle 55 kD TNF-BP cDNA korrekt für die Expression integriert worden war, erfolgte wie bereits beschrieben. Das aus diesen Transformanten isolierte Plasmid erhielt den Namen "pN119".

[0050] Zur Konstruktion des Transfervektors "pN124" wurde folgendermassen vorgegangen. Das in Referenz-Beispiel 9 beschriebene, für den extrazellulären Teil des 55 kD TNF-BP codierende cDNA-Fragment wurde mit den angegebenen Oligonukleotiden mit Hilfe der PCR-Technologie, wie in Beispiel 9 beschriebene amplifiziert. Dieses Fragment wurde mit BamHI und Asp718 geschnitten und aus einem Agarosegel isoliert (F4). Das Plasmid "pNR704" wurde ebenfalls mit BamHI und Asp718 geschnitten und der Vektorrumpf (V4) wurde isoliert (s.o.). Die Fragmente V4 und F4 wurden ligiert, E. coli HB101 damit transformiert und der rekombinante Transfervektor "pN124" wurde, wie beschrieben, identifiziert und isoliert.

[0051] Zur Transfektion der Insektenzellen wurde folgendermassen vorgegangen. 3 µg des Transfervektors "pN113" wurden mit 1 µg DNA des Autographa californica-Nuklear-polyhedrosisvirus (AcMNPV) (EP 127839) in Sf9-Zellen (ATCC CRL 1711) transfiziert. Polyhedrin negative Viren wurden identifiziert und aus "Plaques" gereinigt [52]. Mit diesen rekombinanten Viren wurden wiederum Sf9 Zellen wie in [52] beschriebene infiziert. Nach 3 Tagen in Kultur wurden die infizierten Zellen auf Bindung von TNF mittels ¹²⁵I-TNFα untersucht. Dazu wurden die transfizierten Zellen mit einer Pasteurpipette von der Zellkulturschale abgewaschen und bei einer Zelldichte von 5x10⁶ Zellen/ml Kulturmedium [52], das 10 ng/ml ¹²⁵I-TNF-α enthielt, sowohl in Anwesenheit wie Abwesenheit von 5 µg/ml nichtmarkiertem TNF-α resuspendiert und 2 Stunden auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen mit reinem Kulturmedium gewaschen und die zellgebundene Radioaktivität in einem γ-Zähler gezählt (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2

Zellen	Zellgebundene Radioaktivität pro 10 ⁶ Zellen
nichtinfizierte Zellen (Kontrolle)	60 cpm
infizierte Zellen	1600 ± 330 cpm ¹⁾

¹⁾ Mittelwert und Standardabweichung aus 4 Experimenten

Beispiel 1

[0052] Analog zu dem in Referenz-Beispiel 9 beschriebenen Verfahren wurde das für den extrazellulären Bereich des 55 kDa TNF-BP codierende cDNA-Fragment, nun jedoch mit den folgenden Oligonukleotiden als Primer, in einer Polymerasen-Kettenreaktion amplifiziert: Oligonukleotid 1: Oligonukleotid 2:

Sst I

5'-ATA GAG CTC TGT GGT GCC TGA GTC CTC AG-3'

[0053] Dieses

Sst I

5'-TAC GAG CTC GGC CAT AGC TGT CTG GCA TG-3'

cDNA-Fragment wurde in den pCD4-Hy3-Vektor [DSM 5523; Europäische Patentanmeldung Nr. 90107393.2; Japanische Patentanmeldung Nr. 108967/90; US Patent Application Ser.No. 510773/90] ligiert, aus dem die CD4-cDNA über die Sst I-Restriktions-Schnittstellen herausgenommen worden war. SstI-Schnittstellen befinden sich in dem Vektor pCD4-Hy3 sowohl vor wie in dem CD4-Teilsequenzstück wie dahinter. Das Konstrukt wurde mittels Protoplastenfusion nach Oi et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 825-829, 1983) in J558-Myelomzellen (ATCC Nr. TIB6) transfiziert. Transfektanten wurden durch Zugabe von 5 µg/ml Mycophenolsäure und 250 µg/ml Xanthin (Traunecker et al., Eur. J. Immunol. 16, 851-854 [1986]) in das Grundmedium (Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium, 10% fötales Kälberserum, 5 x 10⁻⁵M 2-Mercaptoethanol) selektioniert. Das von den transfizierten Zellen sekretierte Expressionsprodukt konnte mittels üblicher Methoden der Proteinchemie, z.B. TNF-BP-Antikörper-Affinitätschromatographie, gereinigt werden. Falls nicht bereits spezifisch angegeben, wurden zur Kultivierung der verwendeten Zelllinien, zum Klonieren, Selektionieren bzw. zur Expansion der klonierten Zellen Standardverfahren, wie z.B. von Freshney, R.I. in "Culture of Animal Cells", Alan R. Liss, Inc., New York (1983) beschrieben, verwendet.

Literatur

[0054]

1. G.E. Nedwin, S.L. Naylor, A.Y. Sakaguchi, D. Smith, J. Jarrett-Nedwin, D. Pennica, D.V. Goeddel and P.W. Gray: Nucl. Acids Res. 13, 6361, 1985

2. B. Beutler and A. Cerami: *New England J. Med.* 316, 379, 1987
3. L.J. Old: *Science* 230, 630, 1985
4. G. Trinchieri, M. Kobayashi, M. Rosen, R. Loudon, M. Murphy and B. Perussia: *J. exp. Med.* 164, 1206, 1986
5. J. Vilcek, V.J. Palombella, D. Henriksen-de Stefano, C. Swenson, R. Feinman, M. Hirai and M. Tsujimoto: *J. exp. Med.* 163, 632, 1986
6. B.J. Sugarman, B.B. Aggarwal, P.E. Hass, I.S. Figari, M.A. Palladino and H.M. Shepard: *Science* 230, 943, 1985
7. J.R. Gamble, J.M. Harlan, S.J. Klebanoff and M.A. Vadas: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 8667, 1985
8. N. Sato, T. Goto, K. Haranaka, N. Satomi, H. Nariuchi, Y. Mano and Y. Sawasaki: *J. Natl. Cancer Inst.* 76, 1113, 1986
9. A.H. Stolpen, E.C. Guinan, W. Fiers and J.S. Pober: *Am. J. Pathol.* 123, 16, 1986
10. J.S. Pober, L.A. Lapierre, A.H. Stolpen, T.A. Brock, T.A. Springer, W. Fiers, M.P. Bevilacqua, D.L. Mendrick and M.A. Gimbrone: *J. Immunol.* 138, 3319, 1987
11. M. Kawakami, P. Pekala, M. Lane and A. Cerami: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 912, 1982
12. T. Collins, L.A. Lapierre, W. Fiers, J.L. Strominger and J.S. Pober: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 446, 1986
13. G.H.W. Wong and D.V. Goeddel: *Nature* 323, 819, 1986
14. J.W. Lowenthal, D.W. Ballard, E. Böhlein and W.C. Greene: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2331, 1989
15. M.J. Lenardo, C.M. Fan, T. Maniatis and D. Baltimore: *Cell* 57, 287, 1989
16. A.E. Goldfeld and T. Maniatis: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1490, 1989
17. A. Waage, A. Halsteuren and T. Espevik: *Lancet*, Febr. 14, 1987, 355,
18. C.O. Jacob and H.O. McDevitt: *Nature* 331, 356, 1988
19. G.E. Grau, L.F. Fajardo, P. Piguat, B. Allet, P. Lambert and P. Vassalli: *Science* 237, 1210, 1987
20. B. Beutler, I.W. Milsark and A.C. Cerami: *Science* 229, 869, 1985
21. B.B. Aggarwal, T.E. Eessalu and P.E. Hass: *Nature* 318, 665, 1985
22. M. Tsujimoto, Y.K. YiP and J. Vilcek: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 7626, 1985
23. C. Baglioni, S. McCandless, J. Tavernier and W. Fiers: *J. Biol. Chem.* 260, 13395, 1985
24. P. Hohmann, R. Remy, M. Brockhaus and A.P.G.M. van Loon: *J. Biol. Chem.*, im Druck
25. F.C. Kull, S. Jacobs and P. Cuatrecasas: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 5756, 1985
26. A.A. Creasy, R. Yamamoto and Ch.R. Vitt: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 3293, 1987
27. G.B. Stauber, R.A. Aiyer and B.B. Aggarwal: *J. Biol. Chem.* 263, 19098, 1988
28. K. Hirano, K. Yamamoto, Y. Kobayashi and T. Osawa: *J. Biochem.* 105, 120, 1989
29. Y. Niitsu, N. Watanabe, H. Sone, H. Neda, N. Yamauchi, M. Maeda and I. Urushizaki: *J. Biol. Resp. Modifiers* 7, 276, 1988
30. I. Olsson, A. Grubb, U. Gullberg, M. Lantz, E. Nilsson, C. Peetre and H. Thysell: Abstract, 2nd Intern. Conference on Tumor Necrosis Factor and Related Cytokines, Napa, California, 15.-20. Januar 1989
31. H.R. Lötscher and M. Brockhaus: Abstract, 2nd Intern. Conference on Tumor Necrosis Factor and Related Cytokines, Napa, California, 15.-20. Januar 1989
32. M. Brockhaus, H. Lötscher, H.-P. Hohmann und W. Hunziker: Abstract, 2nd Intern. Conference on Tumor Necrosis Factor and Related Cytokines, Napa, California, 15.-20. Januar 1989
33. C.R. Cantor and P.R. Schimmel, in *Biophysical Chemistry*, W.H. Freeman, ed., San Francisco, 1980, p. 850
34. M.W. Hunkapiller, E. Lujan, F. Ostrander, L.E. Hood: *Methods Enzymol.* 91, 227, 1983
35. U.K. Lamli: *Nature* 227, 680, 1970
36. T.St. John, W.M. Gallatin, M. Siegelman, H.T. Smith, V.A. Fried and I.L. Weissman: *Science* 231, 845, 1986
37. M. Siegelman, M.W. Bond, W.M. Gallatin, T.St. John, H.T. Smith, V.A. Fried and I.L. Weissman: *Science* 231, 823, 1986
38. H. Towbin, T. Staehelin and J. Gordon: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350, 1979
39. Dinarello, Ch.A., in *Lymphokines*, Vol. 14, E. Pick, ed., p. 1, Academic Press, London, 1987
40. D.J. Merchant, R.H. Kahn and W.H. Murphy: *Handbook of Cell and Organ Culture*, Burgess Publ. Co., Minneapolis, 1969
41. G.E. Grau, T.E. Taylor, M.E. Molyneux, J.J. Wirima, P. Vassalli, M. Hommel and P. Lambert: *New Engl. J. Med.* 320, 1586, 1989
42. J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
43. F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.A. Smith, J.G. Seidman and K. Struhl: *Current Protocols in Molecular Biology 1987-1988*, S. Wiley and Sons, New York, 1987
44. E. Harlow and D. Lane: *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Publications, New York, 1988
45. S.Fazekas de St. Groth and D. Scheidegger: *J. Immunol. Methods* 35, 1, 1980
46. D. Pennica and D.V. Goeddel, in *Lymphokines*, Vol. 13, D.R. Webb and D.V. Goeddel, eds. p. 163, Academic

Press, London, 1987

47. J. Tavernier, L. Franzen, A. Marmenout, J. van der Heyden, R. Muller, M. Ruyschaert, A. van Vliet, R. Banden and W. Fiers, in Lymphokines, Vol. 13, D.R. Webb and D.V. Goeddel, eds., p. 181, Academic Press, London

48. P.J. Fraker and J.C. Speck: Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 849, 1987

49. D.H. Erlich, D.H. Gelfand, R.K. Saiki: Nature 331, 61, 1988

50. Bosserhoff, J. Wallach and R.W. Frank: J. Chromatogr. 473, 71, 1989

51. R. Lathe: J. Mol. Biol. 183, 1, 1985

52. Luckow and Summers, "A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures", Texas Agricultural Experimental Station, Texas A & M University, Bulletin Nr. 1555, 2nd edition, 1988

Patentansprüche

1. DNA-Sequenzen die eine Kombination aus zwei Teil-DNA-Sequenzen umfassen, wobei die eine Teilsequenz für lösliche TNF-bindende Fragmente von TNF-Rezeptoren kodiert und aus den folgenden DNA-Sequenzen auswählbar ist:

(a) Fragmente von DNA-Sequenzen wie sie in Figur 1 dargestellt sind wie deren komplementären Stränge;
 (b) DNA-Sequenzen, die mit wie unter (a) definierten Fragmenten hybridisieren;
 (c) DNA-Sequenzen, die auf Grund der Entartung des genetischen Codes nicht mit Sequenzen, wie unter (a) und (b) definiert, hybridisieren, aber die für Polypeptide mit genau gleicher Aminosäuresequenz kodieren; und die andere Teil-Sequenz, für alle Domänen der konstanten Region der schweren Kette von humanen Immunglobulinen ausser der ersten Domäne der konstanten Region der schweren Kette von humanen Immunglobulinen der Klasse IgG kodiert.

2. DNA-Sequenzen gemäss Anspruch 1 wobei besagte humane Immunglobuline solche vom Typ Ig1 bzw. Ig3 sind.
3. Von DNA-Sequenzen gemäss einem der Ansprüche 1 oder 2 kodierte rekombinante Proteine.
4. Vektoren, die DNA-Sequenzen gemäss einem der Ansprüche 1 oder 2 enthalten und zur Expression der von diesen DNA-Sequenzen kodierten Proteine in prokaryotischen- wie eukaryotischen Wirtssystemen geeignet sind.
5. Prokaryotische- wie eukaryotische Wirtssysteme, die mit einem Vektor gemäss Anspruch 4 transformiert worden sind.
6. Wirtssysteme gemäss Anspruch 5, wobei diese Säuger- oder Insektenzellen sind.
7. Ein Verfahren zur Herstellung einer Verbindung gemäss Anspruch 3, das dadurch gekennzeichnet ist, dass man ein wie in Anspruch 5 oder 6 beanspruchtes transformiertes Wirtssystem in einem geeigneten Medium kultiviert und aus dem Wirtssystem selbst oder dem Medium diese Verbindung isoliert.
8. Proteine, herstellbar nach einem wie in Anspruch 7 beanspruchten Verfahren.
9. Pharmazeutische Präparate, insbesondere zur Behandlung von Krankheiten bei denen TNF involviert ist, wobei solche Präparate dadurch gekennzeichnet sind, dass sie eine oder mehrere Verbindungen gemäss Anspruch 3 oder 8 oder deren physiologisch verträgliche Salze, gewünschtenfalls in Kombination mit weiteren pharmazeutisch wirksamen Substanzen und/oder nicht-toxischen, inerten, therapeutisch verträglichen Trägermaterialien enthalten.
10. Verwendung einer Verbindung gemäss Anspruch 3 oder 8 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von durch die toxische Wirkung von Endotoxinen hervorgerufenen Zuständen.
11. Verwendung einer Verbindung gemäss Anspruch 3 oder 8 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung pathologischer Zustände in denen TNF als Mediator von Immunantwort oder Entzündung beteiligt ist.
12. Verwendung einer Verbindung gemäss Anspruch 3 oder 8 als Diagnostikum zum Nachweis von TNF in Serum oder anderen Körperflüssigkeiten.
13. Verwendung einer Verbindung gemäss Anspruch 3 oder 8 zum Auffinden von TNF-Agonisten wie TNF-Antagoni-

sten.

Claims

- 5 1. DNA sequences which comprise a combination of two partial DNA sequences, with one of the partial sequences coding for soluble TNF-binding fragments of TNF receptors and being selected from the following DNA sequences:
 - (a) fragments of DNA sequences which are represented in Figure 1 as well as their complimentary strands;
 - (b) DNA sequences which hybridize with the fragments defined under (a);
 - 10 (c) DNA sequences which, because of the degeneration of the genetic code, do not hybridize with sequences as defined under (a) and (b), but which code for polypeptides having exactly the same amino acid sequence; and the other partial sequence coding for all domains of the constant region of the heavy chain of human immunoglobulins except the first domain of the constant region of the heavy chain of human immunoglobulins of class IgG.
- 15 2. DNA sequences in accordance with claim 1, wherein said human immunoglobulins are those of the Ig1 or Ig3 type.
3. Recombinant proteins coded by DNA sequences in accordance with either claim 1 or claim 2.
- 20 4. Vectors which contain DNA sequences in accordance with either claim 1 or claim 2 and which are suitable for the expression in prokaryotic and eukaryotic host systems of proteins coded by these DNA sequences.
5. Prokaryotic and eukaryotic host systems which have been transformed with a vector in accordance with claim 4.
- 25 6. Host systems in accordance with claim 5, which are mammalian or insect cells.
7. A process for the production of a compound in accordance with claim 3, which is characterized by cultivating a host system transformed as claimed in claim 5 or 6 in a suitable medium and isolating said compound from the host system itself or from the medium.
- 30 8. Proteins, producible according to a process as claimed in claim 7.
9. Pharmaceutical preparations, especially for the treatment of illnesses in which TNF is involved, with such preparations being characterized in that they contain one or more compounds in accordance with claim 3 or 8 or their physiologically compatible salts, if desired in combination with additional pharmaceutically active substances and/or non-toxic, inert, therapeutically compatible carrier materials.
- 35 10. The use of a compound in accordance with claim 3 or 8 for the production of a pharmaceutical preparation for the treatment of conditions which are caused by the toxic effect of endotoxins.
- 40 11. The use of a compound in accordance with claim 3 or 8 for the production of a pharmaceutical preparation for the treatment of pathological conditions in which TNF is involved as a mediator of immune response or inflammation.
- 45 12. The use of a compound in accordance with claim 3 or 8 as a diagnostic for the identification of TNF in serum or other body fluids.
13. The use of a compound in accordance with claim 3 or 8 for the detection of TNF agonists and TNF antagonists.

Revendications

- 50 1. Séquences d'ADN qui comportent une combinaison de deux séquences partielles d'ADN, l'une des séquences partielles codant pour des fragments solubles, de récepteurs du TNF, se liant au TNF, et pouvant être choisie parmi les séquences d'ADN suivantes :
 - 55 (a) les fragments de séquences d'ADN telles que représentées sur la Figure 1, ainsi que leurs brins complémentaires,
 - (b) les séquences d'ADN qui s'hybrident aux fragments tels que définis en (a),
 - (c) les séquences d'ADN qui, du fait de la dégénérescence du code génétique, ne s'hybrident pas aux séquen-

ces telles que définies en (a) et (b), mais codent pour des polypeptides ayant exactement la même séquence d'acides aminés ;

et l'autre séquence partielle code pour tous les domaines de la région constante de la chaîne lourde des immunoglobulines humaines, à l'exception des premiers domaines de la région constante de la chaîne lourde des immunoglobulines humaines de la classe des IgG.

5

2. Séquences d'ADN selon la revendication 1, dans lesquelles lesdites immunoglobulines humaines sont celles des types Ig1 ou Ig3.

- 10 3. Protéines recombinantes, codées par les séquences d'ADN selon l'une des revendications 1 ou 2.

4. Vecteurs qui contiennent les séquences d'ADN selon l'une des revendications 1 ou 2, et qui conviennent à l'expression des protéines codées par ces séquences d'ADN dans des systèmes hôtes tant procaryotes qu'eucaryotes.

- 15 5. Systèmes hôtes procaryotes ou eucaryotes, qui ont été transformés avec un vecteur selon la revendication 4.

6. Systèmes hôtes selon la revendication 5, qui sont des cellules de mammifères ou d'insectes.

- 20 7. Procédé de préparation d'un composé selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'on cultive dans un milieu approprié un système hôte transformé tel que revendiqué dans les revendications 5 ou 6, et on isole ce composé du système hôte proprement dit, ou du milieu.

8. Protéines pouvant être préparées par un procédé tel que revendiqué dans la revendication 7.

- 25 9. Préparations pharmaceutiques, en particulier pour le traitement de maladies dans lesquelles est impliqué le TNF, ces préparations étant caractérisées en ce qu'elles contiennent un ou plusieurs composés selon la revendication 3 ou 8 ou leurs sels acceptables d'un point de vue physiologique, éventuellement en combinaison avec d'autres principes actifs pharmaceutiques et/ou des matériaux excipients non-toxiques, inertes, compatibles d'un point de vue thérapeutique.

30

10. Utilisation d'un composé selon la revendication 3 ou 8 pour préparer une composition pharmaceutique destinée au traitement d'états pathologiques provoqués par l'action toxique d'endotoxines.

35

11. Utilisation d'un composé selon la revendication 3 ou 8 pour préparer une composition pharmaceutique destinée au traitement d'états pathologiques dans lesquels le TNF participe en tant que médiateur de la réponse immunitaire ou de l'inflammation.

12. Utilisation d'un composé selon la revendication 3 ou 8 en tant que diagnostic pour détecter le TNF dans le sérum ou d'autres fluides corporels.

40

13. Utilisation d'un composé selon la revendication 3 ou 8 pour détecter tant des agonistes du TNF que des antagonistes du TNF.

45

50

55

Figur 1

-185 GAATTCGGGGGGGTTCAAGATCACTGGGACCAGGCCGTGATCTCTATGCCCGAGTCTCAA
 -125 CCCTCAACTGTCACCCCAAGGCACTTGGGACGTCCTGGACAGACCGAGTCCCGGGAAGCC
 -65 CCAGCACTGCCGCTGCCACACTGCCCTGAGCCCAAATGGGGGAGTGAGAGGCCATAGCTG
 -28.
 -30 MetGlyLeuSerThrValProAspLeuLeuLeuProLeuValLeuLeuGluLeu
 -5 TCTGGCATGGGCCTCTCCACCGTGCTGACCTGCTGCTGCCGCTGGTGCTCCTGGAGCTG
 +1
 -10 LeuValGlyIleTyrProSerGlyValIleGlyLeuValProHisLeuGlyAspArgGlu
 55 TTGGTGGGAATATAACCCCTCAGGGGTATTGGACTGGTCCCTCACCTAGGGGACAGGGAG

 10 LysArgAspSerValCysProGlnGlyLysTyrIleHisProGlnAsnAsnSerIleCys
 115 AAGAGAGATAGTGTGTGTCCCAAGGAAATATATCCACCCCTCAAATAATTGATTGTC
 30 CysThrLysCysHisLysGlyThrTyrLeuTyrAsnAspCysProGlyProGlyGlnAsp
 175 TGTACCAAGTGCCACAAAGGAACCTACTTGTACAATGACTGTCCAGGCCCGGGGCAGGAT
 50 ThrAspCysArgGluCysGluSerGlySerPheThrAlaSerGluAsnHisLeuArgHis
 235 ACGGACTGCAGGGAGTGTGAGAGCGGCTCCTTCACCGCTTCAGAAAACCACCTCAGACAC
 70 CysLeuSerCysSerLysCysArgLysGluMetGlyGlnValGluIleSerSerCysThr
 295 TGCCTCAGCTGCTCCAAATGCCGAAAGGAAATGGGTCAGGTGGAGATCTCTTCTTGACA
 90 ValAspArgAspThrValCysGlyCysArgLysAsnGlnTyrArgHisTyrTrpSerGlu
 355 GTGGACCGGGACACCGTGTGTGGCTGCAGGAAGAACCAGTACCGGCATTATTGGAGTGAA

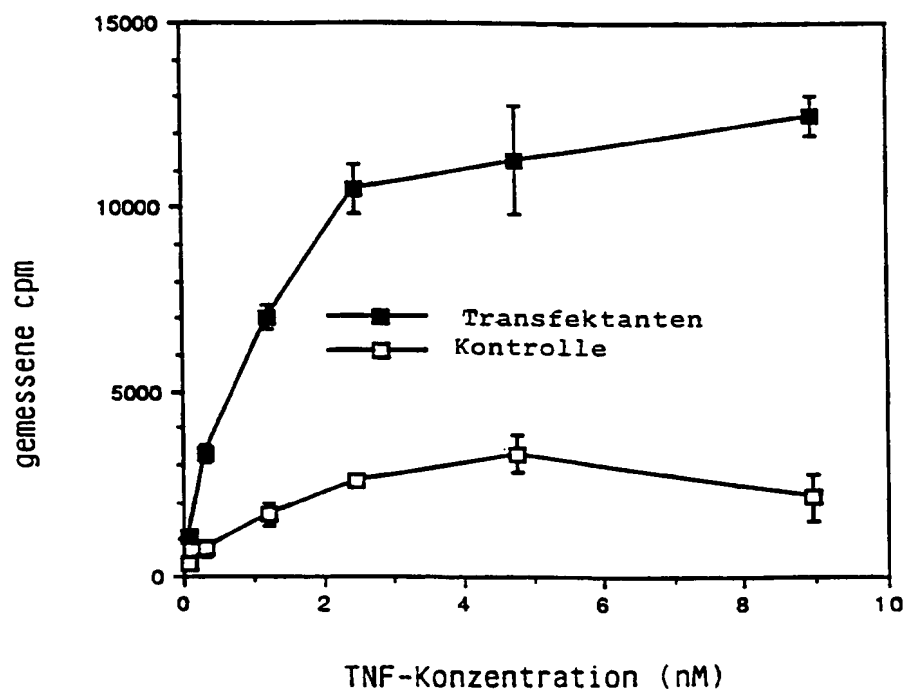
 110 AsnLeuPheGlnCysPheAsnCysSerLeuCysLeuAsnGlyThrValHisLeuSerCys
 415 AACCTTTTCCAGTGCTTCAATTGCAGCCTCTGCCTCAATGGGACCGTGACCTCTCCTGC
 130 GlnGluLysGlnAsnThrValCysThrCysHisAlaGlyPhePheLeuArgGluAsnGlu
 475 CAGGAGAAACAGAACACCGTGTGCACCTGCCATGCAGGTTTCTTTCTAAGAGAAAACGAG
 150 CysValSerCysSerAsnCysLysLysSerLeuGluCysThrLysLeuCysLeuProGln
 535 TGTGTCTCCTGTAGTAAGTGAAGAAAAGCCTGGAGTGCACGAAGTTGTGCCTACCCAG
 170 IleGluAsnValLysGlyThrGluAspSerGlyThrThrValLeuLeuProLeuValIle
 595 ATTGAGAATGTTAAGGGCACTGAGGACTCAGGCACCACAGTGTGTTGCCCTGGTCATT
 190 PhePheGlyLeuCysLeuLeuSerLeuLeuPheIleGlyLeuMetTyrArgTyrGlnArg
 655 TTCTTTGGTCTTTGCCTTTTATCCCTCCTCTTCATTGGTTTAATGTATCGCTACCAACGG
 210 TrpLysSerLysLeuTyrSerIleValCysGlyLysSerThrProGluLysGluGlyGlu
 715 TGGAAAGTCCAAGCTCTACTCCATTGTTTGTGGGAAATCGACACCTGAAAAAGAGGGGAG

 230 LeuGluGlyThrThrThrLysProLeuAlaProAsnProSerPheSerProThrProGly
 775 CTTGAAGGAATACTACTAAGCCCTGGCCCCAAACCAAGCTTCAGTCCCACTCCAGGC
 250 PheThrProThrLeuGlyPheSerProValProSerSerThrPheThrSerSerSerThr
 835 TTCACCCCAACCTGGGCTTCAGTCCCGTGCCAGTTCCACCTTCACCTCCAGCTCCACC
 270 TyrThrProGlyAspCysProAsnPheAlaAlaProArgArgGluValAlaProProTyr
 895 TATACCCCGGTGACTGTCCCAACTTGGCGCTCCCCGCAGAGAGGTGGCACCACCCTAT
 290 GlnGlyAlaAspProIleLeuAlaThrAlaLeuAlaSerAspProIleProAsnProLeu
 955 CAGGGGGCTGACCCCATCCTTGCGACAGCCCTCGCCTCCGACCCCATCCCCAACCCCTT

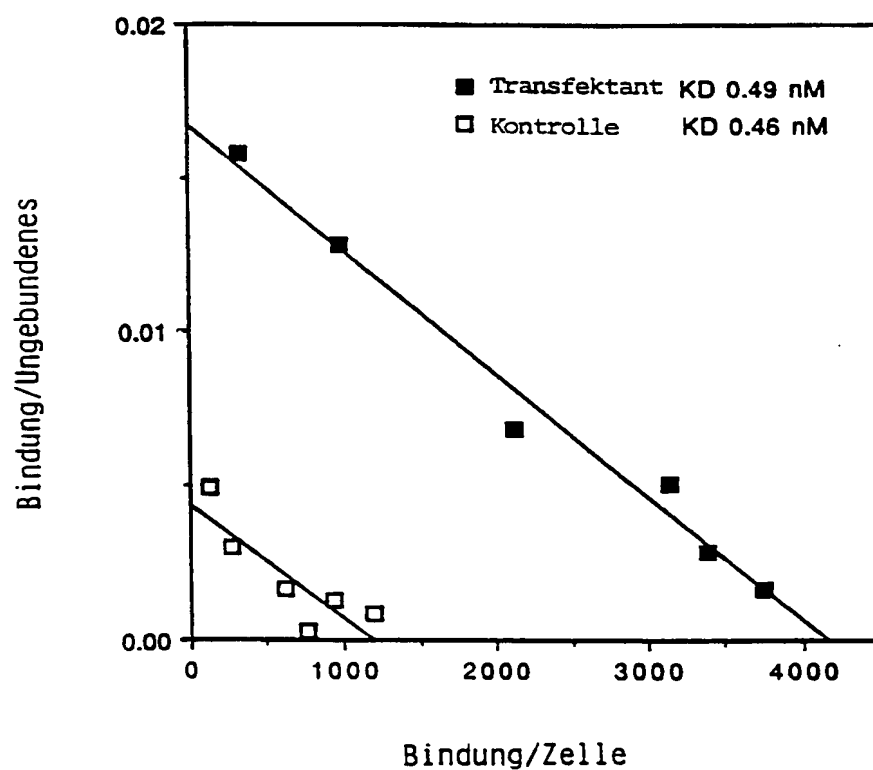
Figur 1a (Forts.)

310 GlnLysTrpGluAspSerAlaHisLysProGlnSerLeuAspThrAspAspProAlaThr
 1015 CAGAAGTGGGAGGACAGCGCCCAAGCCACAGAGCCTAGACACTGATGACCCCGCGACG
 330 LeuTyrAlaValValGluAsnValProProLeuArgTrpLysGluPheValArgArgLeu
 1075 CTGTACGCCGTGGTGGAGAACGTGCCCCGTTGCGCTGGAAGGAATTCGTGCGGCGCCTA
 350 GlyLeuSerAspHisGluIleAspArgLeuGluLeuGlnAsnGlyArgCysLeuArgGlu
 1135 GGGCTGAGCGACCACGAGATCGATCGGCTGGAGCTGCAGAACGGGCGCTGCCTGCGCGAG
 370 AlaGlnTyrSerMetLeuAlaThrTrpArgArgArgThrProArgArgGluAlaThrLeu
 1195 GCGCAATACAGCATGCTGGCGACCTGGAGGCGGCGCACGCCGCGGCGCGAGGCCACGCTG
 390 GluLeuLeuGlyArgValLeuArgAspMetAspLeuLeuGlyCysLeuGluAspIleGlu
 1255 GAGCTGCTGGGACGCGTGCTCCGCGACATGGACCTGCTGGGCTGCCTGGAGGACATCGAG
 410 GluAlaLeuCysGlyProAlaAlaLeuProProAlaProSerLeuLeuArg
 1315 GAGGCGCTTTGCGGCCCGCCGCCCTCCCGCCCGCGCCAGTCTTCTCAGATGAGGCTGC
 1375 GCGGCTGCGGGCAGCTCTAAGGACCGTCCTGCGAGATCGCCTTCCAACCCCACTTTTTTC
 1435 TGGAAAGGAGGGGTCTGCAAGGGCAAGCAGGAGCTAGCAGCCGCCTACTTGGTGCTAAC
 1495 CCCTCGATGTACATAGCTTTTCTCAGCTGCCTGCGCGCCCGCGACAGTCAGCGCTGTGCG
 1555 CGCGGAGAGAGGTGCGCCGTGGGCTCAAGAGCCTGAGTGGGTGGTTTTCGAGGATGAGGG
 1615 ACGCTATGCCTCATGCCCCGTTTGGGTGTCCTCACCAGCAAGGCTGCTCGGGGGCCCCCTG
 1675 GTTCGTCCCTGAGCCTTTTTTACAGTGCATAAGCAGTTTTTTTTGTTTTGTTTTGTTTT
 1735 GTTTTTGTTTTTAAATCAATCATGTTACACTAATAGAACTTGGCACTCCTGTGCCCTCTG
 1795 CCTGGACAAGCACATAGCAAGCTGAACTGTCCTAAGGCAGGGGCGAGCACGGAACAATGG
 1855 GGCCTTCAGCTGGAGCTGTGGACTTTTGATACATACTAAATTCTGAAGTTAAAAAAA
 1915 AACCCGAATTC

Figur 2A

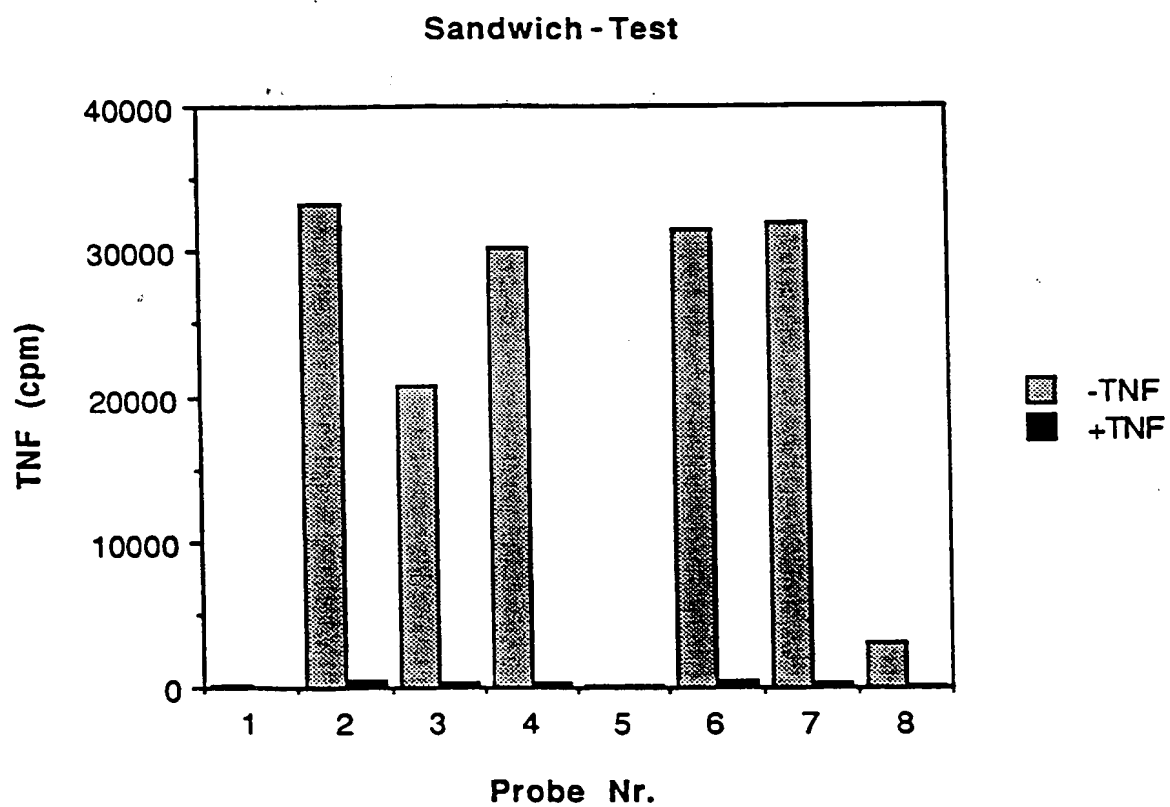


Figur 2B



BEST AVAILABLE COPY

Figur 3



THIS PAGE BLANK (USPTO)